

新疆伊犁地区原牛乳中乳酸菌的多样性分析

王一迪 张艳 关波 张敏 倪永清*

(石河子大学食品学院 新疆 石河子 832000)

摘要:【目的】对新疆伊犁地区原牛奶中乳酸细菌的遗传多样性进行分析。【方法】采用菌落培养、Rep-PCR (Repetitive genomic fingerprinting) 指纹图谱和 16S rRNA 基因序列分析相结合的方法研究牛乳内乳酸菌的遗传多样性。【结果】从 5 份原牛乳中分离出乳酸菌 29 株, 基因序列分析和系统进化分析显示 29 株乳酸菌隶属于 5 个属, 分别为: *Lactococcus*、*Lactobacillus*、*Leuconostoc*、*Pediococcus* 和 *Enterococcus*。优势属为 *Leuconostoc* (27.6%), 其次为 *Lactococcus* (24.0%)。【结论】新疆伊犁地区原牛乳中乳酸菌多样性丰富, 为开发新疆地区益生乳酸菌提供了丰富的活性资源。

关键词: 原牛乳, 乳酸菌多样性, 16S rRNA 基因, 属特异引物

Biodiversity of lactic acid bacteria isolated from raw milk of Yili area in Xinjiang

WANG Yi-Di ZHANG Yan GUAN Bo ZHANG Min NI Yong-Qing*

(School of Food Sciences, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832000, China)

Abstract: [Objective] The genetic diversity of lactic acid bacteria which were isolated from raw milk of Yili area in Xinjiang was analyzed. [Methods] The diversity of lactic acid bacteria was analyzed by using pure culture, repetitive genomic fingerprinting (Rep-PCR) analysis patterns and 16S rRNA gene sequence analysis. [Results] A total of 29 strains of lactic acid bacteria were obtained from five raw milk samples. The phylogenetic analysis showed that these strains belonged to five phylogenetic groups, they were *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* and *Enterococcus* respectively. The dominant genus was *Leuconostoc* (27.6%), followed by *Lactococcus* (24.0%). [Conclusion] The abundant diversity of lactic acid bacteria in the raw milk of Yili area in Xinjiang provided rich resources for exploiting probiotic lactic acid bacteria products.

Keywords: Raw milk, Diversity of lactic acid bacteria, 16S rRNA gene, Genus-specific primer

Foundation item: Special Foundation for the Research and Commercialization of the Modern Agricultural Technologies of the Xinjiang Production and Construction Corps (No. 2015AC003)

*Corresponding author: E-mail: niyqlzu@sina.com

Received: July 31, 2016; **Accepted:** October 17, 2016; **Published online** (www.cnki.net): November 08, 2016

基金项目: 新疆兵团现代农业科技攻关与成果转化项目(No. 2015AC003)

*通讯作者: E-mail: niyqlzu@sina.com

收稿日期: 2016-07-31; 接受日期: 2016-10-17; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-11-08

动物原奶及各种加工乳制品含有丰富的营养物质,千百年来成为人类喜爱的营养食品,同时也为不同的外源微生物提供了理想的栖息生境,形成了复杂多样的微生物组(Microbiota),原奶中的微生物不仅对加工乳品的品质起着重要作用,而且与消费人群的健康密切相关,譬如乳酸菌 *Lactococcus*、*Lactobacillus*、*Streptococcus* 等不仅促进乳品的发酵而且能够抑制乳品中腐败菌的生长, *Lactobacillus*、*Bifidobacterium* 有益于人类的营养吸收,促进免疫系统、大脑的健康发育;但 *Pseudomonas*、*Clostridium*、*Bacillus* 等会造成乳品的腐败变质, *Listeria*、*Salmonella* 等病原菌的存在威胁消费者的健康^[1-2]。因此了解原奶中微生物的组成至关重要。最近研究显示,原乳中的野生型乳酸菌更多是来自养殖动物栖息环境中的牧草、饲料以及排泄物,相对于已经开发的用于乳品发酵的商品化菌株,野生型菌株对乳酸菌泛基因组(Pangenome)的构成做出更大的贡献,其生理特性更加复杂、多样,对乳品发酵过程中特征风味的形成尤为关键^[3]。有学者通过培养的方法研究水牛奶中微生物的组成,其中包含多种乳酸菌(*Lactococci* 和 *Lactobacilli*)、大肠杆菌群^[4]。前期研究发现原牛奶中的乳酸菌主要包括 *Lactococcus*、*Streptococcus*、*Lactobacillus*、*Leuconostoc* 和 *Enterococcus*^[3]。因此,这些菌株的开发潜力巨大。

我国新疆地区地域广袤,南北疆气候差异显著、生态环境复杂、少数民族众多,民族畜牧养殖业历史悠久,动物原奶为乳酸菌提供了得天独厚的栖息环境,为野生型乳酸菌菌株的开发提供了条件。目前,有关新疆地区乳酸菌多样性的研究报道绝大多数来自少数民族的发酵乳品^[5-6],而对于原奶中乳酸菌的多样性鲜有报道。我们前期对新疆伊犁地区的原牛乳进行了广泛的取样,对原奶中的微生物多样性正在进行分析。本文对原牛奶中的乳酸菌进行了初步的分离、筛选、鉴定,以期为后期优良的乳酸菌菌株的开发提供理论指导,为我国区域特色乳品的加工奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源:所用的5份原牛奶全部来自新疆伊犁地区牧民家中,其中从伊犁哈萨克自治州昭苏市(代号 ZS)采集到4份样品,另外1份原乳样品来自伊犁哈萨克自治州特克斯县(TKS),采集时间为2015年10月,所采集样品的牧场均为家庭散养型,并无自动的挤奶设备。奶样具体信息见表1。样品收集前对奶牛乳头进行消毒处理,并丢弃挤出的第一把奶。实验人员在无菌条件下收集样品,将装有20 mL 奶样的无菌离心管放置在-10℃的车载冰箱内,24 h 内运回实验室4℃保存,并尽快进行乳酸菌的分离。

1.1.2 参考菌株: *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CGMCC 1.3992 和 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CGMCC 1.1936 由石河子大学食品学院提供。

1.1.3 主要试剂和仪器:用于分离乳酸菌的选择性培养基为 M17 琼脂(HB0390)、肠球菌琼脂培养基(HB0133)、MRS 固体培养基(HB0384)和 MRS 肉汤(HB0384-1),青岛科技园海博生物技术有限公司;2×EsTaq Master Mix (Dye),北京康为世纪生物科技有限公司;Marker I (MD101),天根生化科技(北京)有限公司;PCR 引物,由上海杰瑞生物科技有限公司合成。PCR 仪、电泳仪、凝胶成像系统等,美国 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 乳酸菌的分离培养:在无菌条件下吸取0.1 mL 样品于0.9 mL 的生理盐水(质量分数0.85%)

表1 新疆伊犁地区原牛乳采集点及分离乳酸菌数
Table 1 Information of raw milk from Yili of Xinjiang

样品编号 Sample No.	采集地 Site	分离乳酸菌数 Number of LAB
ZS19	昭苏吐格勒牧场	3
ZS22	昭苏灯塔牧场	3
ZS25	昭苏灯塔牧场	10
ZS30	昭苏军马场场部	6
TKS57	特克斯喀拉达拉乡	7

中,充分混匀,以 10 倍稀释法对其进行梯度稀释后,吸取 200 μL 稀释度为 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 的稀释液分别均匀地涂布于 M17 琼脂、肠球菌琼脂培养基和 MRS 固体培养基中。37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中倒置培养 48 h,从 3 种选择性培养基中挑取形态学特征不同的单个菌落画线接种于 MRS 琼脂培养基上,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后重复画线 2 次,观察记录菌落形态并进行接触酶试验。挑取过氧化氢酶试验阴性菌落接种于 MRS 肉汤培养基中,培养 24 h 后进行革兰氏染色,在显微镜下观察记录细菌形态及排列方式,最后将革兰氏染色阳性、过氧化氢酶试验阴性的菌株确定为疑似乳酸菌,吸取 1 mL 纯培养物至含有 20%甘油的保藏管中,备用^[7]。另吸取 1 mL 菌液用于 DNA 的提取。

1.2.2 乳酸菌属间鉴定:尿素法提取的基因组 DNA 用作乳酸菌属间鉴定^[8]。其中革兰氏染色呈杆状的乳酸菌使用 *Lactobacilli* sp.引物扩增,具体步骤参考文献^[9],球状的乳酸菌则采用 *Enterococcus* sp.和 *Lactococcus* sp.引物进行 PCR 扩增^[10-11]。各属特异性引物的信息见表 2。扩增反应结束后,取约 3 μL 的 PCR 扩增产物用 1.0%的琼脂糖凝胶电泳检测。根据产物是否有目的条带,将大多数乳酸菌鉴定至属。

1.2.3 16S rRNA 基因序列分析:采用通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-TACCTTGTACGACTT-3')扩增菌株的 16S rRNA 基因序列^[12]。PCR 扩增体系:2 \times EsTaq Master Mix 12.5 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 27F 0.5 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 1492R 0.5 μL , 100 mg/L DNA 模板 2 μL , ddH₂O 9.5 μL 补

足 25 μL 。扩增条件为:94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,55 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min,30 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 7 min。PCR 产物利用 1%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.4 Rep-PCR 指纹图谱:以菌株基因组 DNA 为模板,(GTG)₅ (5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3')为引物进行 Rep-PCR 扩增^[13]。PCR 扩增程序参照文献^[14]。取约 6 μL PCR 扩增产物在 1.5%琼脂糖凝胶上以 2 V/cm 的速度电泳 2 h,缓冲液为 1 \times TAE。Rep-PCR 凝胶产物在溴化乙锭(EB)下染色后,使用配有 CCD 拍照系统计算机的紫外灯观察并拍照。挑取不同图谱类型的 16S rRNA 基因 PCR 产物送至上海生工生物工程技术有限公司进行测序分析。

1.2.5 构建系统发育树:16S rRNA 基因扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测合格后,根据图谱分型结果选择代表菌株委托上海生工生物工程技术有限公司进行测序。测序结果在 GenBank 中进行 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)同源性搜索,获得同源性相近的菌种序列^[15]。经 ClustalX 多重比对后,运用 MEGA 5.0 (<http://www.megasoftware.net>)软件,Bootstrap 值为 1 000 次,采用 Neighbor-Joining 法构建系统树检测各分支的置信度,对各菌株的系统发育地位进行分析^[16]。

2 结果与分析

2.1 乳酸菌的分离纯化及属间鉴定

从 5 份原牛乳样品中分离纯化获得 29 株革兰氏阳性、过氧化氢酶阴性的纯培养物(表 1),并初步确定为疑似乳酸菌。在显微镜下观察显示其菌体形态,其中球状菌 21 株,排列方式有单个、短链和

表 2 文中所用属间引物信息
Table 2 Oligonucleotide primers used in this study

属 Genus	引物 Primer	正向/反向 R/F	引物序列 Primer sequence (5'→3')	产物大小 Size (bp)	参考文献 Reference
<i>Enterococcus</i> sp.	Ent1	R	TACTGACAAACCATTCATGATG	112	[11]
	Ent2	F	AACCTTCGTCACCAACGCGAAC		
<i>Lactobacilli</i> sp.	LbLMA1-rev	R	CTCAAAACTAAACAAAGTTTC	250	[9]
	R16-1	F	CTTGTACACACGCCCGTCA		
<i>Lactococcus</i> sp.	1RL	R	TTTGAGAGTTTGATCCTGG	700	[10]
	2RR	F	TCTACGCATTTCACCGCTA		

成对。杆状的 7 株。在 MRS 琼脂培养基上,其菌落形态为白色的菌株有 14 株,为淡黄色的菌株有 5 株,为灰白色的菌株有 7 株,剩余 3 株为乳白色;大部分菌株的菌落体积较小,有 23 株直径大约在 1 mm 以下,其余 5 株菌的菌落体积稍大,大约在 1–2 mm。利用属间引物进行 PCR 扩增,条带结果显示:6 株菌属于 *Lactococcus* (图 1); *Lactobacillus* 占到 7 株;而只有 1 株归属于 *Enterococcus*。

2.2 16S rRNA 基因扩增及系统发育树的构建

采用通用引物 27F 和 1492R 扩增 16S rRNA 基因,产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测后,可以观察到在 1.5 kb 左右有明显条带,并且无弥散现象(图略),满足测序的要求。结合菌落形态特征、属间 PCR 扩增结果和 Rep-PCR 指纹图谱分型结果,选择 10 株代表菌株进行测序,获得长度为 1 400 bp 左右的序列。代表菌株的 16S rRNA 基因序列提交至 GenBank,获得序列号 KX583568–KX583570、KX583572、KX583574、KX583577、KX583579 和 KX583580。利用 MEGA 5.0 软件对分离株 16S rRNA 基因和 BLAST 比对结果进行聚类分析,构建系统进化树(图 2)。

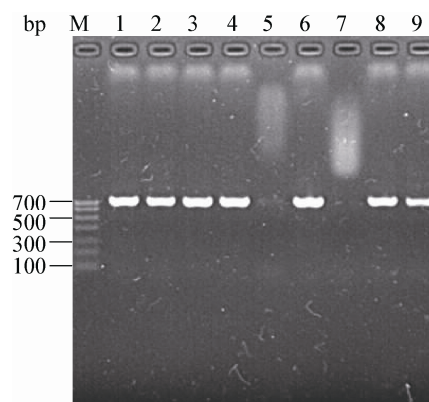


图 1 利用 *Lactococcus* spp. 属间引物扩增结果

Figure 1 PCR amplification products from *Lactococcus* spp.

Note: M: Trans DNA marker I; 1: ZS30140; 2: ZS22094; 3: ZS30131; 4: ZS25118; 5: ZS25112; 6: ZS30136; 7: TKS57041; 8: TKS57022; 9: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CGMCC 1.1936^T. According to the band, 1, 2, 3, 4, 6 and 8 were classified into *Lactococcus*.

从图 2 中可以看出, ZS30139 与菌株 *Leuconostoc lactis* PT121 聚为一类,且相似性为 100%; ZS25110 与 *L. garlicum* L1 极为相似,相似性为 99%; TKS57027 与 *L. citreum* YKC002 具有 100% 的相似性。在 *Lactobacillus* 中, ZS25114 与 *L. reuteri* URCS11 聚为一类(100%); ZS22092 与

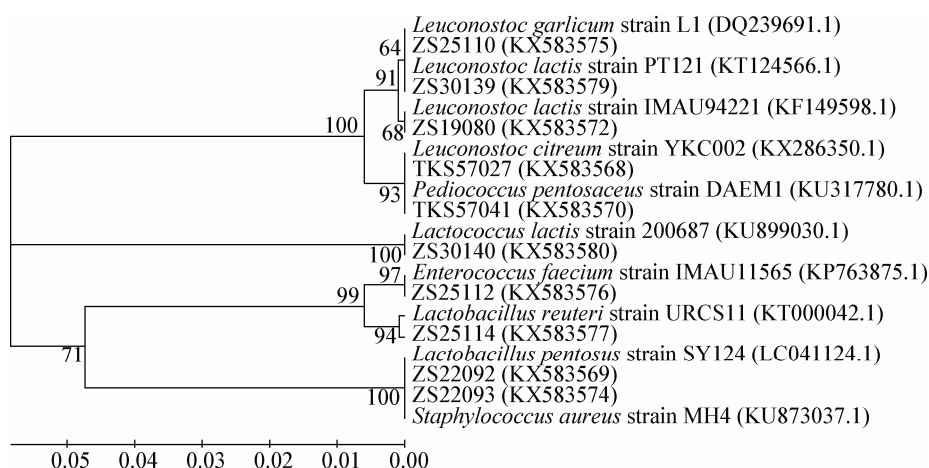


图 2 新疆伊犁地区原牛乳中代表菌株的 16S rRNA 基因序列的系统发育树

Figure 2 Phylogenetic tree of 16S rRNA gene sequences of representative isolates in raw milk from Yili of Xinjiang

注: 序列的登录号位于圆括号内; 系统发育树分支点处的数字表示基于 1 000 重复取样数据集的 Bootstrap 支持率(>50%); 标尺表示 100 个核苷酸中有 1 个被替换。

Note: The accession number is shown in parenthesis; Numbers at the branch points indicated the level of bootstrap support based on 1 000 resampled data sets (>50%); The scale bar corresponds to 0.01 substitutions per nucleotide position.

L. pentosus SY124 聚为一类, 且相似性为 99%。*Lactococcus* 和 *Pediococcus* 各只检测出一个种, 其中 ZS30140 与 *Lactococcus lactis* 200687 相似度达到 99% ;TKS57041 与 *Pediococcus pentosaceus* DAEM1 聚为一类, 相似性为 99%。ZS25112 与 *Enterococcus faecium* IMAU11565 在进化关系上相近, 相似度为 98%。在样品 ZS22 中, ZS22093 与 *Staphylococcus aureus* MH4 具有 100%的相似性。

2.3 新疆伊犁地区原牛奶中优势菌种分析

通过传统的生理生化实验、DNA 指纹图谱分型以及 16S rRNA 基因序列鉴定, 从新疆伊犁地区采集的 5 份原牛乳样品中共分离出 29 株乳酸菌。其中 4 份采集自昭苏的样品共分离出 22 株乳酸菌, 1 份特克斯县的样品中分离出 7 株乳酸菌。

如表 3 所示, 伊犁地区原牛乳中乳酸菌隶属于 5 个属, 分别为: *Lactococcus*、*Lactobacillus*、*Leuconostoc*、*Pediococcus* 和 *Enterococcus*。*Lactococcus lactis* 在 4 份样品中出现, 共分离得到 7 (24%)株, 为伊犁地区原牛乳中的优势乳酸菌。*Pediococcus pentosaceus* 在 3 份样品中检测到, 仅次于 *Lactococcus lactis*。而 *Lactobacillus pentosus*、*Leuconostoc citreum* 和 *Enterococcus faecium* 分别只出现在样品 ZS22、TKS57 和 ZS25 中。值得一提的

是在 ZS22 样品中分离出一株 *Staphylococcus aureus*。

3 结论与讨论

虽已有很多关于新疆地区发酵乳中乳酸菌多样性的研究, 但疆内原奶中乳酸菌的多样性鲜有报道。本研究共从原牛乳中分离出 8 种乳酸菌, 隶属于 5 个属, 其中 *Leuconostoc* (27.6%)为优势属, 其次为 *Lactococcus* (24.0%)。Masoud 等采用高通量测序技术从丹麦原牛奶中检测出 256 种细菌, 其中 *Streptococcus thermophilus* 和 *Lactococcus lactis* 为优势菌株, 分别占到 43.7%和 19.0%^[17]。Ercolini 等研究意大利坎帕尼亚地区原牛奶细菌多样性时发现 *Pseudomonas* spp.为其中的优势菌^[18], 与本实验结果存在差异。这表明, 在原牛奶中, 因其季节、地理位置等差异, 乳酸菌会形成多样的生态位, 进一步揭示了不同采样条件下乳酸菌群多样性存在差异^[19-20]。

生奶酪是以鲜牛奶为原料, 未经任何处理在自然环境中发酵而成的乳制品。与巴氏消毒奶酪相比, 生奶酪具有更高的营养价值和风味。新疆地区, 由于其独特的气候和地理条件, 当地牧民生产出风味迥异的生奶酪。近年来, 随着人们对营养需求的

表 3 新疆伊犁地区不同原牛乳样品中乳酸菌分布							
Table 3 The distribution of lactic acid bacteria in raw milk from Yili of Xinjiang							
菌株鉴定结果 Identification result	样品编号 Sample No.					Total	相似性 Identity (%)
	ZS19	ZS22	ZS25	ZS30	TKS57		
<i>L. lactis</i>	—	1	1	3	2	7	99
<i>L. reuteri</i>	1	—	5	—	—	6	100
<i>L. pentosus</i>	—	1	—	—	—	1	99
<i>S. aureus</i>	—	1	—	—	—	1	100
<i>L. lactis</i>	1	—	1	2	—	4	100
<i>L. garlicum</i>	1	—	1	—	—	2	99
<i>L. citreum</i>	—	—	—	—	2	2	100
<i>P. pentosaceus</i>	—	—	1	1	3	5	99
<i>E. faecium</i>	—	—	1	—	—	1	98
Total	3	3	10	6	7	29	

注: —: 样品中未分离到。
Note: —: No strain in sample.

不断提高,新疆地区发酵乳中乳酸菌的组成受到了广泛的关注。研究表明,在新疆各种发酵乳中检测到 *Lactobacillus* spp.、*Lactococcus* spp.、*Leuconostoc* spp.、*Enterococcus* spp.、*Streptococcus* spp.和 *Staphylococcus* spp.^[21-22]。其中,董晓婉等利用 PCR-DGGE 技术分析新疆和布克赛尔县传统乳制品中乳酸菌发现瑞士乳杆菌(*Lactobacillus helveticus*)的丰度最高,是酸奶样品中主要的优势菌群,乳酸片球菌(*Pediococcus acidilactici*)为次优势菌群^[5]。孙天松等从新疆地区 30 份酸马奶中分离出 152 株乳杆菌, *L. helveticus* 为优势菌^[22]。本研究中,原牛乳的优势乳酸菌属为球状的 *Leuconostoc*,与发酵乳制品中优势乳酸菌差异较大。其原因可能为乳酸杆菌属对酸的耐受性通常高于乳酸球菌,随着发酵的延长,耐酸性差的乳酸球菌难以存活,因此发酵乳制品中优势乳酸菌多为杆状^[23]。

乳球菌包含 7 个种、2 个亚种和 1 个生物群,其中, *Lactococcus lactis* sp. *lactis* 和 *Lactococcus lactis* sp. *cremoris* 在原乳、奶酪等(不加热)乳制品中占主导地位,此类乳酸菌在原料奶生产奶酪时是自然存在的,它们也经常添加到巴氏杀菌乳中以促进商业奶酪制造^[24]。本研究所使用的原牛奶样品中的优势菌株为 *Lactococcus lactis*,与文献报道一致。此外,乳酸杆菌广泛存在于植物、动物、青贮饲料和原料等富含碳水化合物的基质中,它们的蛋白水解活性、产生香气化合物和胞外多糖的能力有助于提高乳制品营养价值^[25]。因此,乳酸杆菌,特别是植物乳酸杆菌在乳品行业中非常重要。本实验分离得到益生乳杆菌 *Lactobacillus reuteri* 和 *Lactobacillus pentosus*,为进一步开发新疆地区优质乳酸菌提供了优良资源。

我们在样品 ZS22 中还分离得到一株 *Staphylococcus aureus*。众所周知,金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)是人类一种重要的病原菌,隶属于葡萄球菌属(*Staphylococcus*),可引起许多严重感染。有学者专门分析了意大利北部地区原牛奶和奶酪中葡萄球菌的多样性及特性,结果表明

Staphylococcus equorum (12%)为其优势菌株^[26]。本实验在原牛奶中分离到此种病原菌可能是由于奶牛乳头与外界环境接触频繁而携带^[27]。

本研究采用传统培养与 16S rRNA 基因测序相结合的方法鉴定新疆伊犁地区原牛乳中乳酸菌的多样性。与免培养的高通量测序方法相比,培养与分子结合的方法不但可以增加菌株鉴定的准确率,还能筛选出所需菌种,然后通过分离、浓缩等工序制备发酵剂,应用于食品发酵生产。

参 考 文 献

- [1] Quigley L, O'Sullivan O, Stanton C, et al. The complex microbiota of raw milk[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2013, 37(5): 664-698
- [2] Vacheyrou M, Normand AC, Guyot P, et al. Cultivable microbial communities in raw cow milk and potential transfers from stables of sixteen French farms[J]. International Journal of Food Microbiology, 2011, 146(3): 253-262
- [3] Quigley L, O'Sullivan O, Beresford TP, et al. Molecular approaches to analysing the microbial composition of raw milk and raw milk cheese[J]. International Journal of Food Microbiology, 2011, 150(2/3): 81-94
- [4] Han BZ, Meng Y, Li M, et al. A survey on the microbiological and chemical composition of buffalo milk in China[J]. Food Control, 2007, 18(6): 742-746
- [5] Dong XW, Li BK, Lu SL, et al. Analysis of lactic acid bacteria in traditional dairy products by culture-independent and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) methods[J]. Food and Fermentation Industries, 2014, 40(3): 97-101 (in Chinese)
董晓婉, 李宝坤, 卢士玲, 等. 传统分离培养结合 PCR-DGGE 技术分析传统乳制品中的乳酸菌[J]. 食品与发酵工业, 2014, 40(3): 97-101
- [6] Wei Y, Zeng XQ, Pan DD, et al. Identification of dominant lactic acid bacteria isolated from different fermented milk in Xinjiang of China[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2012, 12(12): 161-166 (in Chinese)
魏艳, 曾小群, 潘道东, 等. 新疆地区不同酸奶中优势乳酸菌的分离与鉴定[J]. 中国食品学报, 2012, 12(12): 161-166
- [7] Ling DW. The Taxonomic Identification of Lactic Acid Bacteria and Experimental Method[M]. Beijing: China Light Industry Press, 1999: 117-128 (in Chinese)
凌代文. 乳酸细菌分类鉴定及实验方法[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999: 117-128
- [8] Feng GD, Chen MB, Yang SZ, et al. A comparative study on bacteria DNA extraction methods used for PCR amplification[J]. Journal of South China Agricultural University, 2013, 34(3): 439-442 (in Chinese)
冯广达, 陈美标, 羊宋贞, 等. 用于 PCR 扩增的细菌 DNA 提取方法比较[J]. 华南农业大学学报, 2013, 34(3): 439-442
- [9] Dubernet S, Desmasures N, Guéguen M. A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level[J]. FEMS Microbiology Letters, 2002, 214(2): 271-275
- [10] Pu ZY, Dobos M, Limsowtin GKY, et al. Integrated polymerase chain reaction-based procedures for the detection and identification of species and subspecies of the Gram-positive bacterial genus *Lactococcus*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2002, 93(2): 353-361
- [11] Ke DB, Picard FJ, Martineau F, et al. Development of a PCR

- assay for rapid detection of *Enterococci*[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1999, 37(11): 3497-3503
- [12] Ordentlich A, Elad Y, Chet I. The role of chitinase of *Serratia marcescens* in biocontrol of *Sclerotium rolfsii*[J]. Phytopathology, 1988, 78(1): 84-88
- [13] Gevers D, Huys G, Swings J. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species[J]. FEMS Microbiology Letters, 2001, 205(1): 31-36
- [14] Versalovic J, Schneider M, de Bruijn FJ, et al. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction[J]. Methods in Molecular and Cellular Biology, 1994, 5(1): 25-40
- [15] Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs[J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(17): 3389-3402
- [16] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA 5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28(10): 2731-2739
- [17] Masoud W, Vogensen FK, Lillevang S, et al. The fate of indigenous microbiota, starter cultures, *Escherichia coli*, *Listeria innocua* and *Staphylococcus aureus* in Danish raw milk and cheeses determined by pyrosequencing and quantitative real time (qRT)-PCR[J]. International Journal of Food Microbiology, 2012, 153(1/2): 192
- [18] Ercolini D, Russo F, Ferrocino I, et al. Molecular identification of mesophilic and psychrotrophic bacteria from raw cow's milk[J]. Food Microbiology, 2009, 26(2): 228-231
- [19] Psoni L, Tzanetakis N, Litopoulou-Tzanetaki E. Microbiological characteristics of Batzos, a traditional Greek cheese from raw goat's milk[J]. Food Microbiology, 2003, 20(5): 575-582
- [20] Foschino R, Invernizzi A, Barucco R, et al. Microbial composition, including the incidence of pathogens, of goat milk from the Bergamo region of Italy during a lactation year[J]. Journal of Dairy Research, 2002, 69(2): 213-225
- [21] Yuan XL, Yang J, Hu M, et al. Preliminary analysis the diversity of lactic acid bacteria in traditional fermented yogurt Kashi, Xinjiang[J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 36(10): 202-204,219 (in Chinese)
- 袁雪林, 杨洁, 胡敏, 等. 新疆喀什地区传统发酵酸乳中乳酸菌多样性的初步分析[J]. 食品工业科技, 2015, 36(10): 202-204,219
- [22] Sun TS, Wang JG, Zhang LB, et al. The biodiversity of lactic acid bacteria isolated from Koumiss-A traditional fermented mare milk product in Xinjiang of China[J]. Microbiology China, 2007, 34(3): 451-454 (in Chinese)
- 孙天松, 王俊国, 张列兵, 等. 中国新疆地区酸马奶中乳酸菌生物多样性的初步研究[J]. 微生物学通报, 2007, 34(3): 451-454
- [23] Gaya P, Babin M, Medina M, et al. Diversity among *Lactococci* isolated from ewes' raw milk and cheese[J]. Journal of Applied Microbiology, 1999, 87(6): 849-855
- [24] Smit G, Smit BA, Engels WJM. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2005, 29(3): 591-610
- [25] Bernardeau M, Vernoux JP, Henri-Dubernet S, et al. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Lactobacillus* genus[J]. International Journal of Food Microbiology, 2008, 126(3): 278-285
- [26] Ruaro A, Andrighetto C, Torriani S, et al. Biodiversity and characterization of indigenous coagulase-negative *Staphylococci* isolated from raw milk and cheese of North Italy[J]. Food Microbiology, 2013, 34(1): 106-111
- [27] Braem G, de Vlieghe S, Verbist B, et al. Culture-independent exploration of the teat apex microbiota of dairy cows reveals a wide bacterial species diversity[J]. Veterinary Microbiology, 2012, 157(3/4): 383-390